

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 月 1 5 日
Date of Application:

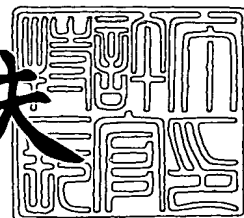
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 0 7 4 8 2
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 0 7 4 8 2]

出 願 人 東 洋 紡 績 株 式 会 社
Applicant(s):

2 0 0 4 年 1 月 1 9 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 0 0 7 2 0

【書類名】 特許願

【整理番号】 81802JP

【提出日】 平成15年 1月15日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01J 1/00

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市竹園3丁目35-10

 【氏名】 山本 雅之

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市春日2丁目45-1 ル・ヴァン春日4
 07号室

 【氏名】 本橋 ほづみ

【発明者】

 【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社内

 【氏名】 京 基樹

【発明者】

 【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社内

 【氏名】 川上 文清

【発明者】

 【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社内

 【氏名】 川村 良久

【特許出願人】

 【識別番号】 000003160

 【氏名又は名称】 東洋紡績株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100065215

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 三枝 英二

 【電話番号】 06-6203-0941

【選任した代理人】

【識別番号】 100076510

【弁理士】

【氏名又は名称】 掛樋 悠路

【選任した代理人】

【識別番号】 100086427

【弁理士】

【氏名又は名称】 小原 健志

【選任した代理人】

【識別番号】 100090066

【弁理士】

【氏名又は名称】 中川 博司

【選任した代理人】

【識別番号】 100094101

【弁理士】

【氏名又は名称】 館 泰光

【選任した代理人】

【識別番号】 100099988

【弁理士】

【氏名又は名称】 斎藤 健治

【選任した代理人】

【識別番号】 100105821

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100099911

【弁理士】

【氏名又は名称】 関 仁士

【選任した代理人】

【識別番号】 100108084

【弁理士】

【氏名又は名称】 中野 睦子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001616

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9709328

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 二本鎖オリゴヌクレオチドアレイ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 金属基板上に複数の二本鎖オリゴヌクレオチドが固定化されたアレイであり、第一の一本鎖オリゴヌクレオチドと第二の一本鎖オリゴヌクレオチドとが全体的あるいは部分的に相補的に結合して二本鎖オリゴヌクレオチドを形成しており、該二本鎖オリゴヌクレオチドにおいて第一の一本鎖オリゴヌクレオチドのみが基板上に結合している二本鎖オリゴヌクレオチドアレイ。

【請求項 2】 第一の一本鎖オリゴヌクレオチドが、5' 末端あるいは3' 末端側に官能基あるいは結合グループを有し、該官能基あるいは結合グループを介して基板上に結合している請求項 1 に記載のアレイ。

【請求項 3】 金属基板が、表層に金薄層が形成された透明基板である請求項 1 又は 2 に記載のアレイ。

【請求項 4】 第一の一本鎖オリゴヌクレオチドが、金属基板上に密に充填された二官能基型アルカンに直接的或いは間接的に結合することによって基板上に結合している請求項 3 に記載のアレイ。

【請求項 5】 (1) 第一の一本鎖オリゴヌクレオチドと第二の一本鎖オリゴヌクレオチドをハイブリダーゼーションさせて、第一の一本鎖オリゴヌクレオチドと第二の一本鎖オリゴヌクレオチドが全体的あるいは部分的に相補的に結合した二本鎖オリゴヌクレオチドを形成する工程、次いで、(2) 第一の一本鎖オリゴヌクレオチドの末端を金属基板上に結合させて、金属基板上に(1)で形成した二本鎖オリゴヌクレオチドを固定化する工程を含む二本鎖オリゴヌクレオチドアレイの作成方法。

【請求項 6】 第一の一本鎖オリゴヌクレオチドが5' 末端あるいは3' 末端側に官能基あるいは結合グループを有し、該官能基あるいは結合グループを介して第一の一本鎖オリゴヌクレオチドの末端を金属基板上に結合させる請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】 金属基板が表層に金薄層が形成された透明基板である請求項 5 又は 6 に記載の方法。

【請求項 8】 第一の一本鎖オリゴヌクレオチドの末端を、金薄層上に密に充填された二官能基型アルカンに直接的或いは間接的に結合させて、金属基板上に結合させる請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】 請求項 5 ～ 8 のいずれかに記載の方法により作成された二本鎖オリゴヌクレオチドアレイ。

【請求項 10】 請求項 1 ～ 5 又は 9 のいずれかに記載の二本鎖オリゴヌクレオチドアレイを用いて、二本鎖オリゴヌクレオチドアレイに固定化されたオリゴヌクレオチドと生体分子又はその集合体との相互作用を測定する工程を有する生体分子相互作用測定方法。

【請求項 11】 オリゴヌクレオチドと生体分子又はその集合体との相互作用を、表面プラズモン共鳴法を用いて測定する請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】 オリゴヌクレオチドと生体分子又はその集合体との相互作用を、表面プラズモン共鳴イメージング法を用いて測定する請求項 10 又は 11 に記載の方法。

【請求項 13】 生体分子がタンパク質である請求項 10 ～ 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】 タンパク質が転写因子である請求項 13 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、二本鎖オリゴヌクレオチドが固定化されたアレイ及び該アレイを用いて相互作用解析を行う方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来から遺伝子を検出する方法として DNA アレイの技術が用いられてきた。DNA アレイは、一本鎖 DNA を基板上に固定化しておき、その DNA に相補的な核酸がハイブリダイゼーションしたかどうかを蛍光ラベルや化学発光などを用いて検出するのが一般的である。

【0003】

近年、核酸同士の相互作用だけでなく、DNA-タンパク質相互作用などの異なる生体分子相互作用の観察が注目をあびてきている。その理由として核酸配列に特異的なタンパク質の存在が広く知られるようになったことが挙げられる。中でも結合・解離の相互作用が重要視されている。

【0004】

従来、DNA-タンパク質の結合・解離の相互作用評価として一般的な方法はゲルシフト法であり、DNA-タンパク質を相互作用させた状態で、ゲル内の移動速度を観察する方法が行われてきた。しかし、ゲルシフト法はスループットが低く、多量のサンプルを扱うのは非常に困難である。また、平衡状態を測定するため、結合・解離速度の評価は不可能である。

【0005】

そこで、DNAアレイの技術を応用して、二本鎖DNAのアレイを作製し、タンパク質との相互作用を解析する方法が探索されてきた。例えば同一のプライマー部分を有する一本鎖DNAをアレイ状に固相に固定化しておき、プライマーをハイブリダイゼーションさせた上で、表面上でのポリメラーゼ操作によって二本鎖とする方法が知られている（例えば特許文献1参照）。この方法は同一のプライマー部分を有する長い一本鎖DNAを固定化している場合は効果がある。しかし、基板上でのDNAポリメラーゼの反応条件の最適化、反応操作は煩雑である。また、特許文献1では二本鎖DNAは緑色蛍光蛋白（GFP）などによってラベル化されたタンパク質との相互作用が観察されているが、ラベル操作はタンパク質の機能や特性を変える可能性が指摘されており、DNA-タンパク質相互作用を普遍的に測定できる方法とは言えない。

【0006】

一方、基板上で酵素処理を行わず、二本鎖DNAをハイブリダイゼーションさせてから、電極基板上に固定化し、酵素との相互作用を観察する方法も報告されている（例えば非特許文献1参照）。ここでは金基板に結合性をもつチオール基をDNA分子に導入しておき、金基板に直接固定化する方法をとっている。しかし、この方法は電極全体に二本鎖DNAを固定化するもので、アレイの概念は示されていない。また、この方法では、DNA分子は金表面に横たわる形でも存在

することが知られており（例えば非特許文献2参照）、DNA分子が基板に近すぎてDNA分子のモビリティが十分に確保できないことから、タンパク質との相互作用キネティクス（K i n e t i c s）を正確に測定することは困難となる。また、DNA分子だけで金表面に自己組織化によって固定化すると密に充填できないため、メルカプトヘキサノールでブロッキングする必要がある。メルカプトヘキサノールの方が自己組織化能は強く、先に金に固定化したDNA分子とメルカプトヘキサノールの交換反応がおこるため、表面に残るDNA分子の密度は極めて低くなり、タンパク質との相互作用によって得られる信号は非常に小さくなる。

【0007】

また、アレイ上でDNA-タンパク質相互作用を観察する報告もされている（例えば非特許文献3参照）。ここでは二種類の一本鎖DNAを固定化しておき、片方に相補的なDNAをアレイ全体に曝し、片方のみをハイブリダーゼーションさせた後、一本鎖結合型蛋白（SSB）との相互作用を表面プラズモン共鳴（SPR）イメージング法によって観察している。しかし、この方法では、配列の近いDNAが固定化される場合、ミスマッチでもハイブリダイゼーションしてしまい、配列が似かよった二本鎖DNAアレイを作成することは困難である。またチップ全体に相補的なDNAを曝すことにも限界がある。

【0008】

【特許文献1】

米国特許 6326489

【0009】

【非特許文献1】

Boonら Nature Biotechnology 20 (2002) 282-286.

【0010】

【非特許文献2】

Tonyaら J. Am. Chem. Soc. 119 (1997) 8916-8920.

【0011】

【非特許文献3】

Brockmanら J. Am. Chem. Soc. 121 (1999) 8044-8051.

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は二本鎖オリゴヌクレオチドを固定化したアレイ並びに該アレイを用いて生体分子の相互作用を適切に測定する方法を提供することを主な課題とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決することを主な目的として、鋭意検討を重ねた。その結果、金属基板上に二本鎖オリゴヌクレオチド配列が複数固定化されたアレイであって、二本鎖オリゴヌクレオチドにおける第一の一本鎖オリゴヌクレオチドのみが基板上に固定化されており、第二の一本鎖オリゴヌクレオチドは第一のオリゴヌクレオチドと全体的あるいは部分的に相補的に結合している二本鎖オリゴヌクレオチドアレイを用いることにより、適切な測定が行い得ることを見出し、更に検討を重ねて、本発明を完成するに至った。

【0014】

即ち、本発明は、次の事項に関する。

【0015】

1. 金属基板上に複数の二本鎖オリゴヌクレオチドが固定化されたアレイであり、第一の一本鎖オリゴヌクレオチドと第二の一本鎖オリゴヌクレオチドとが全体的あるいは部分的に相補的に結合して二本鎖オリゴヌクレオチドを形成しており、該二本鎖オリゴヌクレオチドにおいて第一の一本鎖オリゴヌクレオチドのみが基板上に結合している二本鎖オリゴヌクレオチドアレイ。

【0016】

2. 第一の一本鎖オリゴヌクレオチドが、5'末端あるいは3'末端側に官能基あるいは結合グループを有し、該官能基あるいは結合グループを介して基板上に結合している項1に記載のアレイ。

【0017】

3. 金属基板が、表層に金薄層が形成された透明基板である項1又は2に記載のアレイ。

【0018】

4. 第一の一本鎖オリゴヌクレオチドが、金属基板上に密に充填された二官能基型アルカンに直接的或いは間接的に結合することによって基板上に結合している項3に記載のアレイ。

【0019】

5. (1) 第一の一本鎖オリゴヌクレオチドと第二の一本鎖オリゴヌクレオチドをハイブリダーゼーションさせて、第一の一本鎖オリゴヌクレオチドと第二の一本鎖オリゴヌクレオチドが全体的あるいは部分的に相補的に結合した二本鎖オリゴヌクレオチドを形成する工程、次いで、(2) 第一の一本鎖オリゴヌクレオチドの末端を金属基板上に結合させて、金属基板上に(1)で形成した二本鎖オリゴヌクレオチドを固定化する工程を含む二本鎖オリゴヌクレオチドアレイの作成方法。

【0020】

6. 第一の一本鎖オリゴヌクレオチドが5'末端あるいは3'末端側に官能基あるいは結合グループを有し、該官能基あるいは結合グループを介して第一の一本鎖オリゴヌクレオチドの末端を金属基板上に結合させる項5に記載の方法。

【0021】

7. 金属基板が表層に金薄層が形成された透明基板である項5又は6に記載の方法。

【0022】

8. 第一の一本鎖オリゴヌクレオチドの末端を、金薄層上に密に充填された二官能基型アルカンに直接的或いは間接的に結合させて、金属基板上に結合させる項7に記載の方法。

【0023】

9. 項5～8のいずれかに記載の方法により作成された二本鎖オリゴヌクレオチドアレイ。

【0024】

10. 項1～5又は9のいずれかに記載の二本鎖オリゴヌクレオチドアレイを用いて、二本鎖オリゴヌクレオチドアレイに固定化されたオリゴヌクレオチドと生体分子又はその集合体との相互作用を測定する工程を有する生体分子相互作用測定方法。

【0025】

11. オリゴヌクレオチドと生体分子又はその集合体との相互作用を、表面プラズモン共鳴法を用いて測定する項10に記載の方法。

【0026】

12. オリゴヌクレオチドと生体分子又はその集合体との相互作用を、表面プラズモン共鳴イメージング法を用いて測定する項10又は11に記載の方法。

【0027】

13. 生体分子がタンパク質である項10～12のいずれかに記載の方法。

【0028】

14. タンパク質が転写因子である項13に記載の方法。

【0029】

本発明は、好ましくは、金属基板上に複数の二本鎖オリゴヌクレオチドが固定化されたアレイであり、5'末端あるいは3'末端側に官能基あるいは結合グループを有する第一の一本鎖オリゴヌクレオチドと、第二の一本鎖オリゴヌクレオチドとが全体的あるいは部分的に相補的に結合して二本鎖オリゴヌクレオチドを形成しており、該二本鎖オリゴヌクレオチドにおいて第一の一本鎖オリゴヌクレオチドのみが該官能基あるいは結合グループを介して基板上に結合している二本鎖オリゴヌクレオチドアレイに係る。

【0030】

より好ましくは、表層に金薄層を有する透明基板上に複数の二本鎖オリゴヌクレオチドが固定化されたアレイであり、5'末端あるいは3'末端側に官能基あるいは結合グループを有する第一の一本鎖オリゴヌクレオチドと、第二の一本鎖オリゴヌクレオチドとが全体的あるいは部分的に相補的に結合して二本鎖オリゴヌクレオチドを形成しており、該二本鎖オリゴヌクレオチドにおいて第一の一本

鎖オリゴヌクレオチドのみが該官能基あるいは結合グループを介して金薄層上に密に充填された二官能基型アルカンに直接的或いは間接的に結合して基板上に結合している二本鎖オリゴヌクレオチドアレイに係る。

【0031】

また、本発明は、好ましくは、(1) 5' 末端あるいは 3' 末端側に官能基あるいは結合グループを有する第一の一本鎖オリゴヌクレオチドと、第二の一本鎖オリゴヌクレオチドとをハイブリダーゼーションさせて、第一の一本鎖オリゴヌクレオチドと第二の一本鎖オリゴヌクレオチドが全体的あるいは部分的に相補的に結合した二本鎖オリゴヌクレオチドを形成する工程、次いで、(2) 該官能基あるいは結合グループを介して第一の一本鎖オリゴヌクレオチドの末端を金属基板上に結合させて、金属基板上に(1)で形成した二本鎖オリゴヌクレオチドを固定化する工程を含む二本鎖オリゴヌクレオチドアレイの作成方法に係る。

【0032】

より好ましくは、(1) 5' 末端あるいは 3' 末端側に官能基あるいは結合グループを有する第一の一本鎖オリゴヌクレオチドと、第二の一本鎖オリゴヌクレオチドとをハイブリダーゼーションさせて、第一の一本鎖オリゴヌクレオチドと第二の一本鎖オリゴヌクレオチドが全体的あるいは部分的に相補的に結合した二本鎖オリゴヌクレオチドを形成する工程、次いで、(2) 該官能基あるいは結合グループを介して第一の一本鎖オリゴヌクレオチドの末端を金薄層上に密に充填された二官能基型アルカンに直接的或いは間接的に結合して、表層に金薄層を有する透明基板上に(1)で形成した二本鎖オリゴヌクレオチドを固定化する工程を含む二本鎖オリゴヌクレオチドアレイの作成方法に係る。

【0033】

更に、本発明は、好ましくは、(1) 第一の一本鎖オリゴヌクレオチドと第二の一本鎖オリゴヌクレオチドをハイブリダーゼーションさせて、第一の一本鎖オリゴヌクレオチドと第二の一本鎖オリゴヌクレオチドが全体的あるいは部分的に相補的に結合した二本鎖オリゴヌクレオチドを形成する工程、次いで、(2) 第一の一本鎖オリゴヌクレオチドの末端を金属基板上に結合させて、金属基板上に(1)で形成した二本鎖オリゴヌクレオチドを固定化する工程を含む方法で作成

された二本鎖オリゴヌクレオチドアレイを用いて、オリゴヌクレオチドと生体分子又はその集合体との相互作用を、表面プラズモン共鳴法または表面プラズモン共鳴イメージング法を用いて測定する生体分子相互作用測定方法に関する。

【0034】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0035】

二本鎖オリゴヌクレオチドアレイ

本発明において、二本鎖オリゴヌクレオチドとは二本鎖DNAあるいはDNAとRNAの二重らせん分子のことをいい、本発明においては、アレイ上に複数の二本鎖オリゴヌクレオチドが固定化される。本発明における二本鎖オリゴヌクレオチドは、第一のオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドとが、全体的あるいは部分的に相補的に結合して形成されている。部分的とはどちらかのオリゴヌクレオチドの一部が一本鎖である状態や、ミスマッチを含む塩基対である状態をいう。

【0036】

本発明のアレイにおいては、二本鎖オリゴヌクレオチドを構成する一方の一本鎖オリゴヌクレオチド（第一のオリゴヌクレオチド）のみが、金属基板上に結合しており、もう一方の一本鎖オリゴヌクレオチド（第二のオリゴヌクレオチド）は、第一のオリゴヌクレオチドと相補的にワトソン-クリック対を形成することによって、二本鎖オリゴヌクレオチドの形で、基板上に固定化されている。

【0037】

相補結合をしている第一と第二のオリゴヌクレオチドの融点（ T_m ）は、測定温度よりも高いように設定する。 T_m はオリゴヌクレオチドにおけるGとCが含まれるパーセンテージにも依存するが、一般的な測定温度（25～37℃）で、少なくとも9塩基以上の相補的結合が必要である。また、50塩基以上の長い塩基対は合成が困難であったり、自己相補的塩基対を生じたり、目的の部位と異なる部位でハイブリダイゼーションしたりして、目的の二本鎖オリゴヌクレオチドが得られない危険性が生じる。従って、二本鎖オリゴヌクレオチドにおいて、相補的結

合をしている長さは、9塩基以上50塩基以下が好ましい。より好ましくは、11塩基以上30塩基以下である。相補結合している塩基は連続していることが好ましい。相補結合していれば、相補的結合部分に一部ミスマッチを有するものも含まれる。

【0038】

生体分子との相互作用を観察するためには、生体分子が、オリゴヌクレオチドを認識できる状態が必要である。そのためには、二本鎖オリゴヌクレオチド分子が基板上に横たわらないよう、オリゴヌクレオチドの中央部分ではなく、末端で結合させることが重要である。オリゴヌクレオチドを末端で結合するための方法としては、例えば、第一のオリゴヌクレオチドの末端に官能基を導入し、固体表面に存在する官能基もしくは固体表面に導入した官能基と直接、もしくは架橋剤などを用いて間接的に結合する方法などが挙げられる。このように末端で固定化することで、生体分子がオリゴヌクレオチドを適切に認識でき、正しい評価値を得ることができる。

【0039】

二本鎖オリゴヌクレオチドアレイの作成方法

本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドアレイの作成方法は、特に限定されないが、第一と第二のオリゴヌクレオチドをハイブリダイゼーションし、二本鎖オリゴヌクレオチドとした上で、第一のオリゴヌクレオチドの末端を基板上にアレイ状に固定化する方法が好ましい。

【0040】

より具体的には、(1) 第一の一本鎖オリゴヌクレオチドと第二の一本鎖オリゴヌクレオチドをハイブリダーゼーションさせて、第一の一本鎖オリゴヌクレオチドと第二の一本鎖オリゴヌクレオチドが全体的あるいは部分的に相補的に結合した二本鎖オリゴヌクレオチドを形成する工程、次いで、(2) 第一の一本鎖オリゴヌクレオチドの末端を金属基板に結合させて、金属基板上に(1)で形成した二本鎖オリゴヌクレオチドを固定化する工程を含む方法が好ましい。

【0041】

第一のオリゴヌクレオチドを、先に固定化した後で、第二のオリゴヌクレオチ

ドを配置させる場合には、アレイの同一場所にスポットする必要がある、スポット操作が二回必要となるなど、工程が煩雑となる。そのため、第一と第二のオリゴヌクレオチドは基板に配置される前に、ハイブリダイゼーションを行って、二本鎖オリゴヌクレオチドとすることが好ましい。

【0042】

第一のオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションは、例えば、X5SSC溶液などの塩濃度の高い溶液に、5'チオール末端DNAと相補的DNAがモル比1:1~1:10の範囲で混合し、沸騰浴中にて3-15分、0℃に急冷し5-60分、その後37℃で1-24時間インキュベートするなどのように行う。

【0043】

第一のオリゴヌクレオチドを金属基板に結合する方法としては、第一のオリゴヌクレオチドの末端に官能基あるいは結合グループを導入し、該官能基あるいは結合グループを介して、基板上に直接的あるいは、介在物質を介して間接的に結合する方法が好ましい。官能基や結合グループの種類は特に限定されるものではないが、例えば、アミノ基、チオール基、アルデヒド基、マレイミド基、ビオチンなどが挙げられる。

【0044】

金属基板としては、例えば、金、銀、銅、アルミニウム、クロム等を用いた基板が挙げられる。このうち、特に表層に金薄層が形成された透明基板が好ましい。表層に金薄層が形成されている場合には、特定の物質を基板上に密に充填して金表面に官能基を導入し、第一のオリゴヌクレオチドの末端を該物質の官能基に直接的あるいは間接的に結合させて、オリゴヌクレオチドを基板上に密に固定化することが可能である。

【0045】

金表面に官能基を導入する方法としては、一般式 $X'-R'-Y'$ で表される二官能基型アルカン（ここで X' は金表面と結合する官能基、 Y' は第一オリゴヌクレオチドと結合する官能基を表す。 R' は有機基を表す。）を基板上に密に充填する方法が好ましい。官能基 X' としては、例えば、チオール基、スルフィ

ド基またはジスルフィド基などが挙げられる。Y'としては、例えば、アミノ基、カルボキシル基、アルデヒド基、アジド基、N-ヒドロキシスクシンイミド基、エポキシ基、カルボニルジイミダゾール基、イソシアネート基などが挙げられる。またR'としては、アルキレン基などが挙げられる。アルキレン基の炭素数は特に限定されないが、炭素数が5以上18以下であることが好ましい。炭素数が4未満であると、アルカン鎖同士の疎水結合が十分でなく、自己組織化表面の安定性に欠ける。また19以上であると、アルカン鎖の疎水性が強く、親水性物質の反応・固定化が困難となるだけでなく、センサー表面として疎水性が強いために測定中の非特異的吸着が懸念される。

【0046】

一般式X'-R'-Y'で表される化合物としては、具体的には、Y'がアミノ基となる8-アミノ-1-オクタンチオール (8-Amino-1-Octanethiol)、Y'がカルボキシル基となる7-カルボキシー-1-ヘプタンチオール (7-Carboxy-1-Heptanethiol) などが挙げられる。

【0047】

生体分子相互作用の測定方法

本発明における二本鎖オリゴヌクレオチドアレイは、オリゴヌクレオチドと生体分子又はその集合体との相互作用の測定に、好適に用いることができる。相互作用測定の手段としては、ラベルフリーかつリアルタイム測定が可能な表面プラズモン共鳴 (SPR) 法が好ましい。さらにSPR法においては、SPRイメージング法が好ましい。

【0048】

生体分子の中にはラベル操作によって機能・活性に変化が生じるものがあり、特にタンパク質は、ラベル操作によって、構造が変化したり、活性を失う可能性が高い。SPR法は生体分子を標識化 (ラベル) する必要のない相互作用解析方法であるため、生体分子の機能や活性を維持したまま適切な測定を行うことができる。また該方法により、リアルタイムな測定が可能であり、平衡状態だけではなく、結合と解離の速度を解析することが可能となるため、これらの結果から生体分子の機能を知るための貴重な情報を得ることができる。

【0049】

SPRイメージング法はアレイ全体に偏光平行光を照射し、その反射光をCCDカメラで撮影するため、アレイのある地点における表面プラズモン共鳴角変位を、反射光強度の変化によって知ることが可能である。よって、複数の配列を固定化した二本鎖オリゴヌクレオチドアレイと生体分子の相互作用をラベルフリーかつリアルタイムに測定乃至解析することが可能であり、特に複数の生体分子を固定化したアレイを用いた生体分子相互作用の解析に好適に用いることができる。

【0050】

オリゴヌクレオチドの相互作用の対象となる生体分子は、特に限定されることはないが、例えば、核酸、タンパク質、ペプチド、糖鎖などが挙げられる。またヘテロ二量体などの生体分子の集合体にも適用できる。中でも、本発明はタンパク質の測定に好適に用いることができる。特に、タンパク質の中でも、二本鎖DNAと相互作用することが知られている転写因子の測定に好適に用いることができる。転写因子の種類は特に限定されず、例えば、NF1ファミリー、Mafファミリー、GATAファミリーなどを適用することができる。Mafファミリーはホモ二量体だけではなく、ヘテロ二量体を形成することが知られているが、本発明の方法により、さまざまなヘテロ二量体の組み合わせによる結合挙動の違いの評価や、変異の入った二本鎖DNAと転写因子の相互作用を解析することなどができ、本発明により、生体機能に関する有用な種々の情報を得ることができる。

【0051】

【実施例】

以下に実施例及び参考例を示して本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

【0052】

実施例1

厚さ1mm、18mm×18mmのSF10製透明ガラス基板上にクロム3nmを蒸着した後、金を45nm蒸着した。蒸着の厚みは水晶発振子にてモニターした。金が表面に蒸着された基板を8-Amino-1-Octanethio

1, Hydrochrolide (8-AOT, 同仁化学研究所製) の 1 mM エタノール溶液に 16 時間浸漬し、8-AOT の自己組織化表面を形成させた。分子量 3,400 の末端にスクシンイミド (NHS) 基とマレイミド (MAL) 基を有するヘテロ二官能型ポリエチレングリコール (NHS-PEG-MAL, Sheawater Polymers 社製) をリン酸緩衝液 (20 mM リン酸、150 mM NaCl、pH 7.2) に 10 mg/ml で溶解し、金表面の 8-AOT に 2 時間反応させた。8-AOT のアミノ基と NHS-PEG-MAL の NHS 基が反応し、MAL 基は未反応のまま残るため、PEG を介してマレイミド基を表面に導入することができた。

【0053】

得られた表面に Greiner bio-one 社の Hand spotter を用いて 5' チオール末端の DNA の二種類、ハイブリダーゼーションさせてからスポッティングした。DNA の配列は Maf 認識配列 (MARE25) と、Maf 非認識配列 (MARE23) であり、詳細な配列は図 1 に示す。5' チオール末端からチミン 15 塩基スペーサーを介した後、目的の配列が入るように設計されている。

【0054】

X5SSC 溶液 (75 mM クエン酸ナトリウム、750 mM NaCl、pH 7.0) に 5' チオール末端 DNA が 25 μ M、その相補的 DNA を 100 μ M になるように溶液を調製し、沸騰浴中にて 5 分、0℃ に急冷し 15 分、その後 37℃ で三時間インキュベートし、DNA をハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーションした二本鎖 DNA (dsDNA) をスポッティングし、15 時間反応させて dsDNA を表面に固定化した。

【0055】

dsDNA を固定化した表面をリン酸緩衝液で洗浄した後、SPR イメージング機器 (SPR Imager: GWC Instruments 社製) にセットし、10 mM Hepes、300 mM NaCl、4 mM MgCl₂、1 mM EDTA、100 μ g/ml 牛血清アルブミン、pH 7.9 の転写因子測定用緩衝液をフローセル内に流した。

【0056】

SPRイメージングによって得られる像を図3に示す。dsDNAを固定化した楕円形の部分は、屈折率の変化のために白く見えている。このようにdsDNAを表面に固定化したアレイが形成されている。

【0057】

SPRからのシグナルが安定したのを確認した後に、転写因子MafGのホモ二量体を $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で上記転写因子測定用緩衝液に溶解してセル内に10分間 $100\mu\text{l}/\text{min}$ の速度で注入し、さらに転写因子を含まない緩衝液を流し、結合と解離のSPRシグナルの変化を観察した。

【0058】

観察はMARE25とMARE23の固定化部位と何もDNAが固定化されていない部分（バックグラウンド部位）の三点で実施した。SPRシグナルの変化を示すグラフを図4に示す。MARE25配列のみにMafGホモ二量体が結合し、MARE23、バックグラウンド部位にはほとんど結合しないのが観察でき、結合速度定数 $2.22 \times 10^5 (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$ 、解離速度定数 $8.80 \times 10^{-4} (\text{s}^{-1})$ 、結合平衡定数 $2.52 \times 10^8 (\text{M}^{-1})$ を得た。

【0059】

参考例1

実施例1と同様に、金蒸着透明基板上に8-AOTの自己組織化表面を形成させ、スクシンイミド（NHS）基とマレイミド（MAL）基を有するヘテロ二官能型親水性高分子NHS-PEG-MALを固定化した。

【0060】

次に5'末端にチオールを有するMARE25とMARE23配列の一本鎖DNAを1mMのリン酸緩衝液に溶解し、アレイ状にスポッティングし15時間反応させることで基板上に固定化した。

【0061】

dsDNAを固定化した表面をリン酸緩衝液で洗浄した後、SPRイメージング機器にセットし、フローセル内を塩濃度の転写因子測定用緩衝液で満たした。次にMARE25に相補的なDNAを $1\mu\text{M}$ の濃度で注入し、20分間放置し、

MARE 25 をハイブリダイゼーションさせた。洗浄後、MARE 23 に相補的な DNA を $1\ \mu\text{M}$ の濃度で注入し、20 分間放置し、MARE 23 をハイブリダイゼーションさせた。

【0062】

実施例と同様の方法で MafG ホモ二量体の相互作用を観察したが、MARE 25、MARE 23 の両方に吸着し、転写因子 MafG の特異性は観察できなかった（図 5）。MARE 25 の相補的 DNA が MARE 23 にも結合しているため、目的の二本鎖 DNA アレイを形成できなかったためと考えられる。

【0063】

【発明の効果】

本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドアレイを用いることによって、オリゴヌクレオチドと生体分子又はその集合体との相互作用を適切に解析することが可能となる。

【0064】

また、本発明により、生体分子相互作用の観察に適した二本鎖オリゴヌクレオチドを、効率よく、かつ適切に作成することができる。

【0065】

本発明は、オリゴヌクレオチドと生体分子又はその集合体との相互作用の測定において有用性の高い優れた手段を提供するものである。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、MARE 25 の塩基配列を示す図面である。

【図 2】 図 2 は、MARE 23 の塩基配列を示す図面である。

【図 3】 図 3 は、dsDNA アレイの SPR 像を示す図面である。

【図 4】 図 4 は、MafG ホモ二量体の結合解離曲線（実施例）を示す図面である。

【図 5】 図 5 は、MafG ホモ二量体の結合解離曲線（参考例）を示す図面である。

【書類名】 図面

【図 1】

5' HS-(T)₁₅-CGGAATTTGCTGACTCAGCATTACTC3'

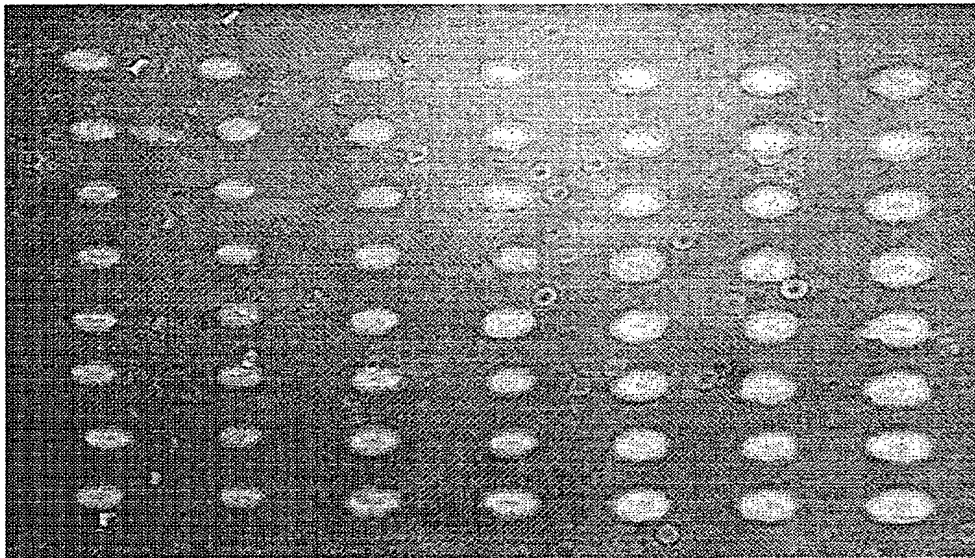
相補的配列 3'GCCTTAACGACTGAGTCGTAATGAG5'

【図 2】

5' HS-(T)₁₅-CGGAATCAATGACTCATTGTTACTC3'

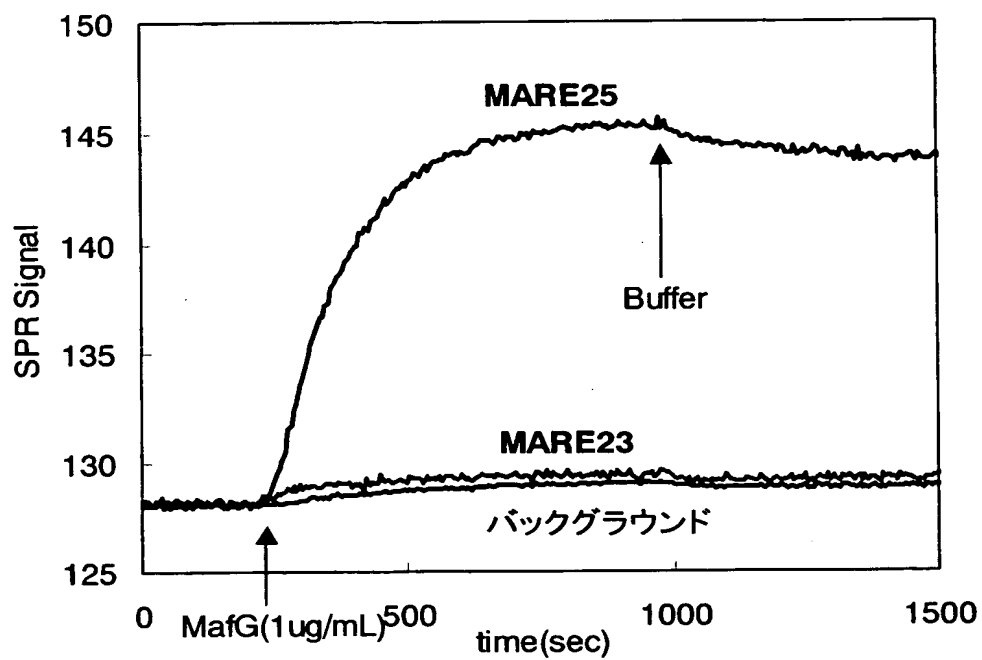
相補的配列 3'GCCTTAGTTACTGAGTAACAATGAG5'

【図 3】

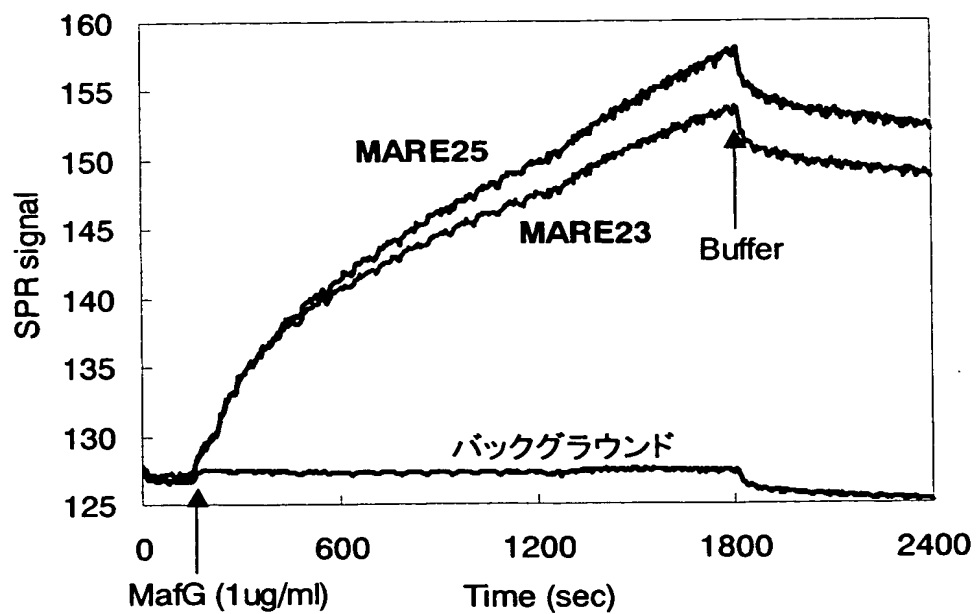


【図 3】 dsDNAアレイのSPR像

【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 二本鎖オリゴヌクレオチドを固定化したアレイを用いて、オリゴヌクレオチドと生体分子またはその集合体との相互作用を適切に測定するための手段を提供すること。

【解決手段】 金属基板上に二本鎖オリゴヌクレオチド配列が複数固定化されたアレイであり、二本鎖オリゴヌクレオチドにおける第一の一本鎖オリゴヌクレオチドは基板上に結合しており、第二の一本鎖オリゴヌクレオチドは第一のオリゴヌクレオチドと全体的あるいは部分的に相補的に結合している二本鎖オリゴヌクレオチドアレイ。

【選択図】 図 4

特願 2 0 0 3 - 0 0 7 4 8 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 3 1 6 0]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 1 0 日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 2 番 8 号
氏 名	東洋紡績株式会社